

3. Methoden der IR-Spektroskopie für Penetrationsuntersuchungen

Ein wesentlicher Schritt zur Optimierung von topischen Formulierungen ist die Bestimmung der Systemparameter. Gängigen Methoden zur Diffusions- oder Penetrationsuntersuchung haben eine Gemeinsamkeit: die Wirkstoffkonzentration im Akzeptor kann erst nach der Beendigung der Experimente bestimmt werden, indem das Donatormedium von dem Akzeptormedium entfernt, der Wirkstoff aus dem Akzeptor extrahiert und anschließend die Wirkstoffkonzentration u.a. mit HPLC, GC oder HPLC-MS bestimmt wird [17, 27, 88]. Ein systematischer Messfehler ist durch den Rest des Donators sowie durch den Extraktionsschritt meist nicht vermeidbar. Aufgrund der geringen Menge des Donators ist weiterhin eine genaue Bestimmung der Konzentration im Donator mit diesen Methoden relativ schwierig. Die Methode ist im wesentlichen nur für die Charakterisierung des Akzeptors geeignet. Alternativ kann ein radioaktiver Wirkstoff verwendet werden [94]. Dies vereinfacht den Wirkstoffanalyseprozess. Da die entsprechenden radioaktiven Wirkstoffe vielfach nicht ausreichend verfügbar sind, ist die Anwendbarkeit dieser Methode auf wenige Wirkstoffe begrenzt. Um das Profil der Wirkstoffkonzentration im Akzeptor zu charakterisieren, wird die „tape stripping“ Methode oft verwendet. Wegen der variierenden Dicke der einzelnen Schichten ist jedoch ein sehr genaues Ergebnis nicht zu erwarten [93].

Die oben genannten Methoden können nur offline durchgeführt werden. Ein Konzentration-Zeit-Profil kann nur mit einem erheblichen Aufwand erstellt werden, da für jeden Zeitpunkt ein Experiment benötigt wird. Die nicht-invasiven Messmethoden ermöglichen, die zeitabhängige Wirkstoffkonzentration im Donator oder Akzeptor relativ einfach zu verfolgen, da die Wirkstoffkonzentration während des Penetrationsprozesses online bestimmt werden kann. Spektroskopische Methoden, insbesondere die abgeschwächte Totalreflexion Spektroskopie und die photoakustische Spektroskopie, wurden aus diesem Grund immer häufiger in Penetrationsuntersuchungen verwendet [120]. In einem solchen Verfahren entfallen die Schritte zur Trennung des Donators und des Akzeptors sowie der Schritt zur Wirkstoffextraktion aus dem Akzeptor. Dadurch wird der systematische Fehler verringert.

Neben den Vorteilen eines geringeren Vorbereitungsaufwands und einer höheren Genauigkeit ermöglichen die spektroskopischen Methoden auch eine gleichzeitige Verfolgung der Diffusion von zwei Substanzen (z.B. Wirkstoff und Enhancer oder Wirkstoff und Komponente der Grundlagen oder zwei Wirkstoffe in einer Kombination-Formulierung), weil jede einzelne Substanz typische Absorptionsbanden aufweist [32].

Da eine enge Verbindung zwischen der Lage oder der Intensität der Absorptionsbanden und der Akzeptorstruktur besteht, ist es in manchen Fällen weiterhin möglich die Strukturänderung des Akzeptors während des Diffusionsprozesses zu verfolgen. In mehreren Untersuchungen wurde die Änderung der SC-Struktur durch Enhancer mit Hilfe der FTIR-ATR Spektroskopie charakterisiert [19, 63, 115, 133, 134, 116].

3.1. FTIR Abgeschwächte Totalreflexion-Spektroskopie

Für Penetrationsuntersuchungen gehört die FTIR-ATR Spektroskopie seit längerer Zeit zu den Standardmesstechniken [79, 80, 83, 89, 129]. Bei dieser Technik wird die Totalreflexion an der Grenzfläche zweier optisch verschieden dichter Medien ausgenutzt. Trifft der IR-Strahl in einem ATR-Kristall mit einem hohen Brechungsindex n_1 schräg auf die Grenzfläche zum optisch dünneren Medium (n_2), so wird der IR-Strahl in den Kristall zurückreflektiert, wenn der Einfallswinkel α_{ATR} den Grenzwinkel der Totalreflexion übersteigt. Das optisch dünnere Medium ist die zu untersuchende Probe. Ein Teil der elektromagnetischen Energie dringt ein

wenig in die Probe ein. Wird der eingedrungene IR-Strahl von der Probe absorbiert, ergeben sich eine ähnliche spektrale Abhängigkeit wie bei Transmissionspektren (s. Abbildung 2). Die Eindringtiefe ist abhängig von dem Einfallswinkel des IR-Strahls und von dem Brechungsindex der Probe [68]:

$$l_{ATR} = \frac{I_{IR}}{2pn_1 \sqrt{\sin^2 a_{ATR} - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}, \quad (3.1.1)$$

dabei ist l_{ATR} die Eindringtiefe und λ_{IR} die Wellenlänge des IR-Strahls.

In den meisten ATR-Messeinheiten wird ein ZnSe-Kristall mit einem Einfallswinkel von 45° oder 60° verwendet. ZnSe hat einen hohen Brechungsindex, ist relativ kostengünstig und besonders gut für Untersuchungen an biologischen Systemen geeignet, weil ZnSe im biologisch relevanten Spektralbereich zwischen 4000 und 600 cm^{-1} keine Eigenabsorption besitzt. Für eine quantitative Untersuchung ist der auswertbare Bereich auf 1900 cm^{-1} bis 750 cm^{-1} begrenzt. Das entspricht einer Eindringtiefe zwischen $0,7$ - $2,1 \text{ }\mu\text{m}$.

Durch eine Änderung des Einfallswinkels sowie eine Verwendung anderer Kristallmaterialien kann die ATR-Eindringtiefe geringfügig verändert werden. In der Untersuchung von Snieder bei 1650 cm^{-1} entspricht die Eindringtiefe in SC mit einem ZnSe-Kristall bei 45° $0,9 \text{ }\mu\text{m}$, bei 60° $0,7 \text{ }\mu\text{m}$ und mit einem Ge-Kristall bei 45° $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ [111]. In anderen Untersuchungen wurde die ATR-Spektroskopie mit der „tape stripping“ Technik kombiniert, um das Konzentrationsprofil in SC zu untersuchen [13, 42].

Aufgrund der Abhängigkeit der Eindringtiefe von der Wellenlänge des IR-Strahls benötigen die gemessenen ATR-Spektren vor der Auswertung eine Korrektur. Dabei wird die Spektralabsorption durch die Wellenlänge dividiert. Die neuen ATR-Spektren sind auf eine konstante Eindringtiefe normiert.

Der Weg d_{ATR} , den die Strahlung in der Probe zurücklegt, wird aus der Eindringtiefe l_{ATR} (mit einem Einfallswinkel von 45°) berechnet:

$$d_{ATR} = AB + BC = 2\sqrt{2}l_{ATR}. \quad (3.1.2)$$

Zur quantitativen Auswertung der Spektraldaten wird das Lambert-Beersche Gesetz verwendet [99]. Für eine wirkstoffhaltige Membran gilt (s. Abbildung 2, 3):

$$I = I_0 \quad \text{für } x = 0, \quad (3.1.3)$$

$$\frac{\partial I}{\partial x} = -b_A I \quad \text{für } 0 < x < d_{ATR}, \quad (3.1.4)$$

dabei ist I_0 die Intensität des Einfallstrahls, I die Intensität des IR-Strahls im Akzeptor und b_A der optische Absorptionskoeffizient der wirkstoffhaltigen Membran. Dieser ist wiederum von der Wirkstoffkonzentration c_W abhängig.

$$b_A = b_M + e_W c_W, \quad (3.1.5)$$

dabei ist β_M der Absorptionskoeffizient der wirkstofffreien Membran und e_W der Extinktionskoeffizient des Wirkstoffes in der Membran. Für einen Spektralbereich, indem das Akzeptormedium keine IR-Absorption besitzt, d.h. $\beta_M = 0$, ist der Absorptionskoeffizient des Akzeptors β_A direkt proportional zur Wirkstoffkonzentration c_W .

Für die Lösung des Differentialgleichungssystems ist zu beachten, dass die Wirkstoffkonzentration im Bereich BC das Spiegelbild der Wirkstoffkonzentration im Bereich AB entspricht (s. Abbildung 3).

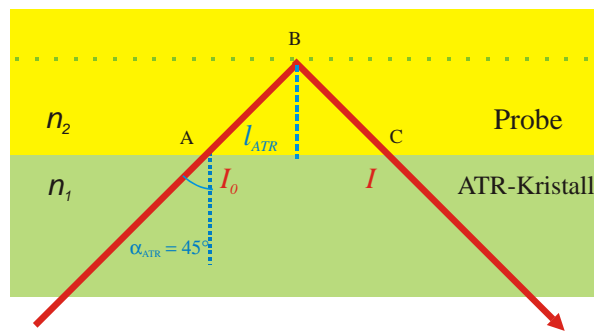


Abbildung 2: Prinzip der ATR-Messtechnik

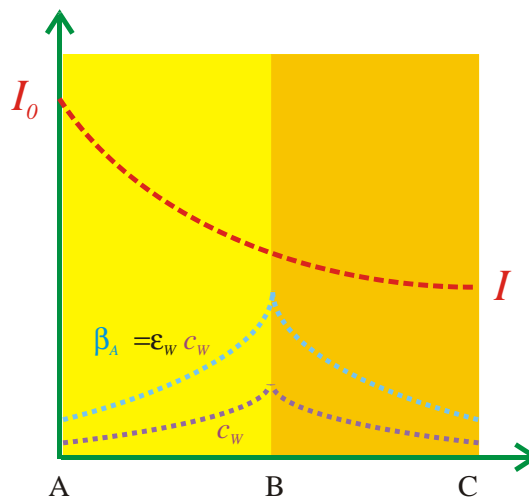


Abbildung 3: Abhängigkeit der IR-Absorption von der Wirkstoffkonzentration bei der ATR-Messtechnik

3.2. FTIR Photoakustische Spektroskopie

Anders als bei der FTIR-ATR Messtechnik basiert die FTIR photoakustische Spektroskopie sowohl auf spektroskopischen als auch thermischen Effekten [4, 91, 99]. Das Messprinzip basiert auf der Bestrahlung der Probe mit einem in seiner Intensität modulierten IR-Strahl. Die Moleküle in der Probe absorbieren die Energie des IR-Strahls und geben sie als Wärmeenergie wieder ab. Da die anregende Strahlung intensitätsmoduliert ist, verläuft auch die resultierende Wärmeproduktion entsprechend periodisch. Die erzeugte Wärmewelle wandert zur Probeoberfläche. Dort wird die Wärmeenergie weiter an das Gasvolumen abgegeben, wodurch Volumenänderungen und Druckwellen (Schallwellen) im Gasraum erzeugt werden. Diese lassen sich von einem empfindlichen Mikrophon erfassen. Alternativ zum IR-Strahl kann auch ein UV-Strahl verwendet werden. Da der UV-Strahl tiefer als der IR-Strahl in die Probe eindringen kann, ist es möglich, einen größeren Bereich der Probe abzutasten. Auf Grund der sehr breiten UV-Banden sind diese Spektraldaten jedoch schwer quantitativ auszuwerten.

Zur Verbesserung der quantitativen Anwendungen der PAS-Technik werden die Spektren im so genannten „step-scan“-Modus mit der Phasenmodulation registriert [110]. Im Unterschied zum „rapid-scan“ Modus durchläuft der bewegliche Spiegel im Interferometer nicht mit konstanter Geschwindigkeit den Scan-Bereich, sondern springt schrittweise von einer Stelle zur nächsten Stelle, an jedem Punkt schwingt er mit einer bestimmten Modulationsfrequenz. Der Punktabstand ist abhängig u.a. von der gewählten spektralen Auflösung. Je höher die Auflösung ist, desto mehr Punkte werden benötigt. Die Anzahl der Schwingungen pro Stellen,

die sogenannten Koadditionen können gewählt werden. Durch eine größere Anzahl der Koadditionen kann ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis erreicht werden

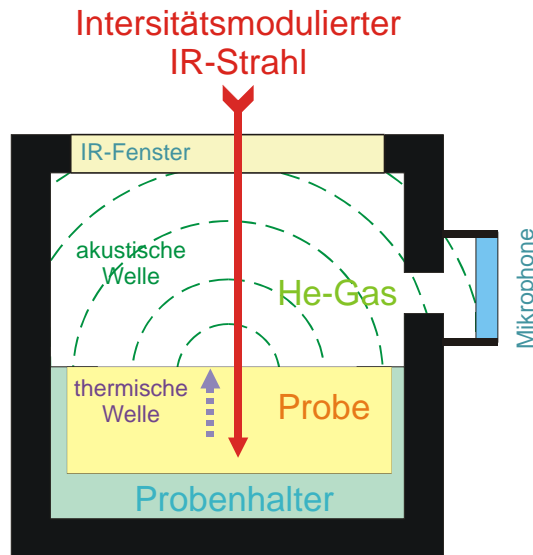


Abbildung 4: Prinzip der PAS-Messtechnik

Eine Messung im „step-scan“ Modus mit einer Phasenmodulation braucht eine längere Messzeit als im „rapid-scan“ Modus, jedoch wird durch die phasenempfindliche Detektion das Signal-Rausch Verhältnis wesentlich erhöht. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist, dass für alle Wellenzahl dieselbe Eindringtiefe gegeben ist.

Mit Hilfe eines phasenempfindlichen Verstärkers wird der „in-phase“ und „in-quadratur“ Teil des Signals, R bzw. I , simultan registriert. Aus diesen beiden Spektrum-Teilen wird das „Magnitude“-Spektrum M berechnet [23]:

$$M = \sqrt{R^2 + I^2} \quad (3.2.1)$$

Neben dem „Magnitude“-Spektrum kann das PA-Spektrum M_f für jede Phase ϕ aus den beiden Signalteilen R und I berechnet werden:

$$M_f = R \cos f + I \sin f \quad (3.2.2)$$

Da die Phase die Abtasttiefe widerspiegelt, ist es möglich den Ursprung des Spektrums zu lokalisieren. Dadurch ist das Tiefenprofil der Probe zugänglich. Die Methode findet breite Anwendung bei der Untersuchung von Polymerschichtsystemen [47, 48]. Ein Modell zur quantitativen Auswertung des Tiefenprofils einer solchen Membran wurde in der Arbeit von Jiang vorgeschlagen [46]. Die Voraussetzung für das Modell ist, dass jede Schicht mindestens eine spezifische Absorptionsbande aufweist. Für Penetrationsuntersuchungen ist das Modell nicht geeignet, da sich die Spektren nur in Intensitätsverhältnissen, jedoch nicht in Bandenpositionen unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung des Tiefenprofils im Akzeptor durch eine Variation der Modulationfrequenz erreicht (s. 3.2.1).

Zur quantitativen Auswertung der Spektraldaten wird ein Modell für die Abhängigkeit der Signalintensität von der Substanzkonzentration benötigt. Der komplexe Vorgang bei der PAS-Technik erfordert eine umfangreichere mathematische Beschreibung als bei der ATR-Technik.

Eine Möglichkeit zur Auswertung der Spektraldaten ist die Anwendung eines einfacheren Modells: das Modell A. Es basiert auf der Annahme, dass die Signalintensität proportional zu der Substanzmenge im erfassten Bereich ist.

Eine weitere Möglichkeit basiert auf einem ausführlichen mathematischen Modell. Dabei

werden die einzelnen Unterprozesse, die IR-Absorption und die Wärmediffusion sowie die Bildung des akustischen Signals, mathematisch beschrieben. Dieses wurde als Modell **B** bezeichnet. Abhängig von den zugänglichen Parametern sowie dem Untersuchungsziel wird das entsprechende Modell im einzelnen Fall ausgewählt.

3.2.1. Modell A zur quantitativen Auswertung der Spektraldaten

Die Wärmediffusion wird durch die Gleichung:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} = \frac{Cr}{k} \left(\frac{\partial U}{\partial t} \right) \quad (3.2.3)$$

beschrieben, dabei ist U die Temperatur, C die spezifische Wärme, r die Dichte und k die Wärmeleitfähigkeit.

Daraus folgt nach Rose für die Temperatur einer periodisch schwingenden Wärmewelle [90]:

$$U = k_T e^{-x\sqrt{\frac{pCr f}{k}}} e^{-ix\sqrt{\frac{pCr f}{k}}} e^{i\omega t}, \quad (3.2.4)$$

dabei ist k_T eine systemspezifische Konstante, f die Modulationsfrequenz und $\omega = 2\pi f$. Die

sehr schnell gedämpfte Amplitude der Schwingung wird durch $k_T e^{-x\sqrt{\frac{pCr f}{k}}}$ ausgedrückt,

$e^{-ix\sqrt{\frac{pCr f}{k}}}$ ist der oszillierende Teil im Raum und $e^{i\omega t}$ der oszillierende Teil in der Zeit. Die Wellenlänge einer thermischen Schwingung ist demnach $\lambda = 2p\sqrt{k/pCr f}$. Die Amplitude der thermischen Welle nach einer Wellenlänge beträgt nur noch 1/535 der Anfangsamplitude. Häufig wird der Begriff die thermische Diffusionslänge μ_{PAS} eingeführt [23]

$$\mu_{PAS} = \sqrt{\frac{k}{pCr f}}. \quad (3.2.5)$$

Sie ist also umgekehrt proportional zur Wurzel aus der Modulationfrequenz. Nach einer thermischen Diffusionslänge ist die Amplitude des IR-Strahls nur noch Ke^{-1} , also ca. 37% der Anfangsamplitude.

Die Grundlage des Modells **A** ist die Annahme, dass die Wärmewellen, die im Bereich tief in der Probe erzeugt werden, nicht zur Bildung des akustischen Signals beitragen können, da ihre Amplitude schnell abgedämpft wird. Nur die Wärmewellen, die im oberen Bereich der Probe erzeugt werden, können sich noch bis zur Probeoberfläche ausbreiten und bewirken eine Druckwelle im Gasraum. Als Grenze zwischen den beiden Bereichen wird die thermische Diffusionslänge μ_{PAS} verwendet. Sie wird auch als Abtasttiefe von PAS betrachtet. Diese Abtasttiefe ist durch die Wahl der Modulationsfrequenzen steuerbar, dadurch ist eine Tiefenprofil-Untersuchung möglich [22].

Bei einer Messung mit einer zu niedrigen Modulationsfrequenz entsteht oft der Sättigungseffekt. Die Bandenintensität ist dann nur noch von der Intensität des IR-Strahls abhängig. In der Messung mit einer zu hohen Modulationsfrequenz ist die Signalintensität so schwach, dass sie sich kaum vom Grundrauschen unterscheidet. Mit der momentan verfügbaren Technik des Spektrometers IFS 28 liegt der akzeptable Bereich zwischen 10 und 500 Hz. Das entspricht eine Abtasttiefe in der Haut (SC, Epidermis) von 100 bis 5 μm . Dem gegenüber beträgt die Eindringtiefe der ATR nur 0,7-2,1 μm .

Für eine wirkstoffhaltige Membran wird im Modell **A** angenommen, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen der Intensität der Spektralbanden und der erfassten Wirkstoffmasse im Bereich der Abtasttiefe vorliegt (s. Abbildung 5). Bei einer kleinen Abtasttiefe, einer geringen Substanzkonzentration und in einem begrenzten Konzentrationsbereich ist diese

Annahme akzeptabel.

Für zwei Modulationsfrequenzen f_0 und $4f_0$ mit der entsprechenden Abtasttiefe μ_0 und $2\mu_0$ gilt für die Signalintensität S_{AC} für den Bereich AC und S_{AB} für den Bereich AB:

$$S_{AC} = S_{AC(M)} + k_{PAS} \int_0^{2\mu_0} c_W(x) dx \quad \text{und} \quad S_{AB} = S_{AB(M)} + k_{PAS} \int_0^{\mu_0} c_W(x) dx, \quad (3.2.6)$$

dabei ist $S_{AC(M)}$ und $S_{AB(M)}$ das Grundsignal der Membran im Bereich AC bzw. AB und k_{PAS} eine systemspezifische Konstante.

Es folgt:

$$S_{AC} - S_{AC(M)} = k_{PAS} \int_0^{2\mu_0} c_W(x) dx \quad \text{und} \quad S_{AB} - S_{AB(M)} = k_{PAS} \int_0^{\mu_0} c_W(x) dx, \quad (3.2.7)$$

Die Zunahme der Signalintensität ist somit direkt proportional zum Integral der ortsabhängigen Wirkstoffkonzentration des erfassten Bereichs.

Im Modell A wurden einzelne Vorgänge der Signalbildung nicht genauer beschrieben. Es hat jedoch den Vorteil, dass zur Auswertung keine weiteren Parameter benötigt werden. Mit diesem Modell ist es möglich, das Tiefenprofil der Wirkstoffkonzentration im Akzeptor zu charakterisieren. Das Modell ist für die Auswertung der Experimente mit dem humanen Stratum corneum gut geeignet. Mit seiner Hilfe ist es möglich, den ortsabhängigen Diffusionskoeffizienten im SC zu bestimmen. Im Experiment wurde das SC simultan bei 5 verschiedenen Modulationsfrequenzen registriert. Zur Auswertung wurde das SC virtuell in 5 Schichten entsprechend geteilt. Aus den experimentellen Daten wurde der Diffusionskoeffizient in den einzelnen SC-Schichten berechnet.

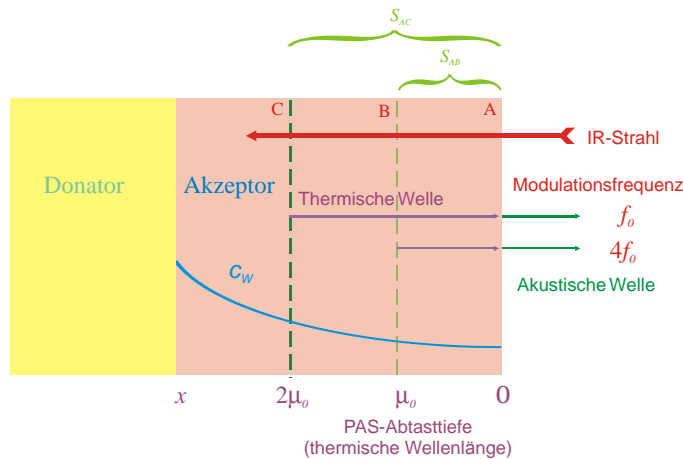


Abbildung 5: Modell A für die quantitative Auswertung der PAS-Daten

3.2.2. Modell B zur quantitativen Auswertung der Spektraldaten

Ein genaueres Modell zur Signalbildung geht auf Rosencwaig-Gersho zurück (RG-Theorie) [92]. In diesem Modell wird die zeitliche und räumliche Veränderung der Temperatur durch eine Wärmediffusionsgleichung beschrieben (s. Abbildung 6) [90].

Der IR-Strahl dringt in die Probe ein und wird absorbiert. Die Abschwächung der Strahlenintensität wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben. Es wird angenommen, dass die absorbierte Lichtenergie vollständig in die Wärmeenergie umgewandelt wird. Die entstehende Wärmewelle breitet sich in der Probe aus und dringt in die Formulierung sowie in den Gasraum ein. Durch die periodische Temperaturänderung in der thermischen Diffusionsschicht des Gasraums entsteht eine periodische Druckänderung. Sie erzeugt eine akustische Welle im Gasraum.

Der Diffusionsprozess wurde in allen Gebieten durch die Wärmediffusionsgleichung beschrieben. Für die Diffusion durch die Grenze zwischen der Membran und der Formulierung sowie zwischen der Membran und dem Gasraum gilt das Prinzip des kontinuierlichen Wärmeflusses. Als Anfangsbedingung gilt, dass die Temperatur bei $t = 0$ überall gleich ist und der Raumtemperatur entspricht. Die Temperatur an den beiden äußeren Grenzen, einerseits zwischen der Formulierung und dem Probenhalter, andererseits zwischen dem Gasraum und dem IR-Fenster, wird als Randbedingung angenommen. Diese Temperatur ist konstant und entspricht der Raumtemperatur.

Nach diesem Modell kann das System in fünf Gebiete unterteilt werden (s. Abbildung 6). Dabei wird Wärmeenergie nur im bestrahlten Bereich der Membran erzeugt. Die Dicke dieser Schicht entspricht der optischen Diffusionslänge des IR-Strahls in der Membran. Im tieferen Bereich der Membran kann die Intensität des IR-Strahls vernachlässigt werden.

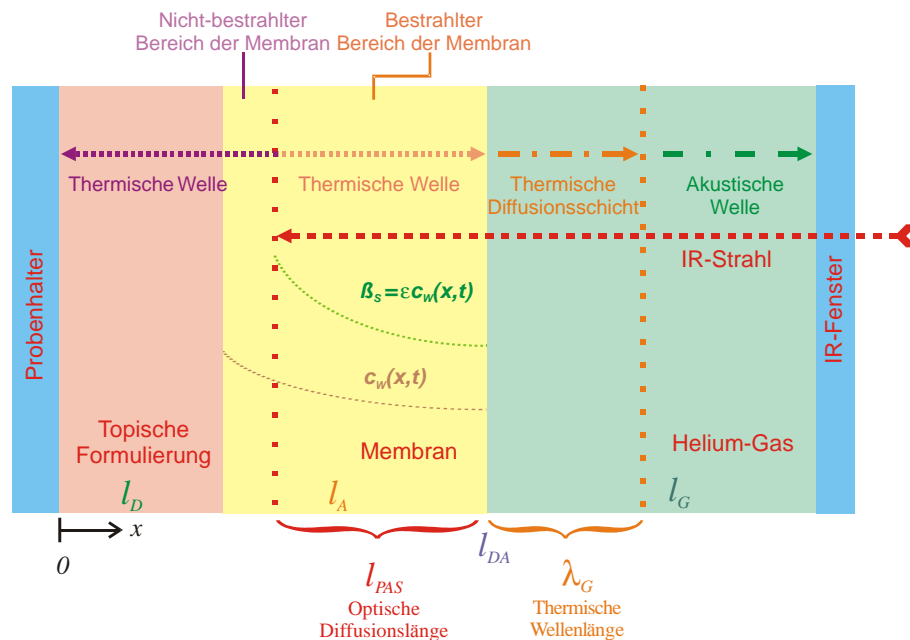


Abbildung 6: Modell B für die quantitative Auswertung der PAS-Daten

Die durch die Absorption von Lichtenergie entstehende Wärmewelle breitet sich in zwei Richtungen aus. Sie dringt sowohl in den nicht-bestrahlten Bereich der Membran und dann in die Formulierung als auch in den Gasraum ein. Die Wärmewelle wird im Gasraum rasch gedämpft. Außerhalb der thermischen Diffusionsschicht, deren Dicke einer Wärmewellenlänge im Gas entspricht, gibt es praktisch keine Wärmewelle mehr. Nach Rosencwaig entsteht die Druckwelle hauptsächlich in dieser Diffusionsschicht.

Die Rosencwaig-Theorie wurde für ein optisch homogenes Medium entwickelt. Die Homogenität der Probe ermöglicht eine einfache mathematische Beschreibung der IR-Absorption nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. In unserem Fall ist der optische Absorptionskoeffizient von der Substanzkonzentration (Wirkstoff oder Enhancer) in der Membran abhängig (s. Kapitel 3.1.).

3.2.2.1. Die Absorption des IR-Strahls im Akzeptor

Für die Intensität des IR-Strahls am rechten Rand des Akzeptors gilt:

$$I(l_{DA}) = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos wt) \quad , \quad (3.2.8)$$

dabei ist I_0 die Amplitude des Einfallstrahls und l_{DA} die gesamte Dicke vom Donator und Akzeptor.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für die optische Absorption im Akzeptor:

$$\frac{\partial I}{\partial x} = -b_A I \quad \text{für } l_{DA} - l_{PAS} < x < l_{DA}. \quad (3.2.9)$$

dabei ist l_{PAS} die optische Diffusionslänge des IR-Strahls.

Es wird angenommen, dass die absorbierte IR-Energie vollständig in Wärmeenergie umgewandelt wird. Daraus folgt für die entstehende Wärmeenergie H :

$$H = b_A I = -\frac{\partial I}{\partial x}. \quad (3.2.10)$$

Für den optischen Absorptionskoeffizienten wird eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration der Komponente (Wirkstoff und/oder Enhancer) angenommen,

$$b_A = b_M + e_W c_W + e_E c_E. \quad (3.2.11)$$

Der Absorptionskoeffizient der reinen Membran entspricht b_M . Die Konzentrationen von Wirkstoff bzw. Enhancer sind c_W und c_E . Die entsprechenden Extinktionskoeffizienten für den Wirkstoff bzw. den Enhancer in der Membran werden durch e_W und e_E dargestellt.

3.2.2.2. Der thermische Diffusionsprozess in der Probe

Zum Zeitpunkt $t=0$ ist die Temperatur U überall gleich und entspricht der Umgebungstemperatur T_0

$$U(x,0) = T_0. \quad (3.2.12)$$

Für die Temperatur im bestrahlten Bereich des Akzeptors U_{bA} gilt:

$$\frac{\partial U_{bA}}{\partial t} = a_M \frac{\partial^2 U_{bA}}{\partial x^2} + \frac{H}{r_M C_M} \quad \text{für } l_{DA} - l_{PAS} \leq x \leq l_{DA}. \quad (3.2.13)$$

Die thermische Diffusivität a_M wird durch die Dichte r_M , die spezifische Wärme C_M und die thermische Leitfähigkeit k_M der Membran ausgedrückt:

$$a_M = \frac{k_M}{r_M C_M}. \quad (3.2.14)$$

Da die Wirkstoffkonzentration in der Membran sehr gering ist, entsprechen die thermischen Eigenschaften der wirkstoffhaltigen Membran weitgehend denen der reinen Membran.

Aus Gleichungen (3.2.10) und (3.2.13) folgt:

$$\frac{\partial U_{bA}}{\partial t} = a_M \frac{\partial^2 U_{bA}}{\partial x^2} + \frac{b_A I}{r_M C_M} \quad \text{für } l_{DA} - l_{PAS} \leq x \leq l_{DA}. \quad (3.2.15)$$

Der erste Term der rechten Seite der Gleichung beschreibt die Wärmediffusion, der zweite Term den Einfluss der internen Wärmequelle.

Für die Temperatur im nicht-bestrahlten Bereich des Akzeptors U_{nA} gilt:

$$\frac{\partial U_{nA}}{\partial t} = a_M \frac{\partial^2 U_{nA}}{\partial x^2} \quad \text{für } l_D \leq x < l_{DA} - l_{PAS}. \quad (3.2.16)$$

An der Grenzfläche zwischen dem bestrahlten und dem nicht-bestrahlten Bereich des Akzeptors gilt:

$$U_{nA}(l_{DA} - l_{PAS}, t) = U_{bA}(l_{DA} - l_{PAS}, t). \quad (3.2.17)$$

Für die Temperatur im Donator U_D gilt:

$$\frac{\partial U_D}{\partial t} = a_D \frac{\partial^2 U_D}{\partial x^2} \quad \text{für } 0 < x < l_D, \quad (3.2.18)$$

dabei ist a_D die thermische Diffusivität der Formulierung.

Für die Grenzfläche zwischen dem Akzeptor und dem Donator gilt das Prinzip des kontinuierlichen Wärmeflusses:

$$U_D(x,t) = U_{nA}(x,t) \quad , \quad (3.2.19)$$

$$k_D \frac{\partial U_D(l_D,t)}{\partial x} = k_M \frac{\partial U_{nA}(l_D,t)}{\partial x} \quad . \quad (3.2.20)$$

Die Wärmeleitfähigkeit des Donators wird durch k_D ausgedrückt.

Die Temperatur am linken Donatorrand bleibt zeitlich konstant

$$U_D(0,t) = T_0 \quad . \quad (3.2.21)$$

Für die Temperatur im Gasraum U_G gilt:

$$\frac{\partial U_G}{\partial t} = a_G \frac{\partial^2 U_G}{\partial x^2}, \quad l_{DA} < x < l_{DA} + l_G \quad (3.2.22)$$

dabei ist a_G die thermische Diffusivität des Gases und l_G die Länge des Gasraums.

Für die Grenzfläche zwischen dem Akzeptor und dem Gasraum gilt das Prinzip des kontinuierlichen Wärmeflusses:

$$U_{bA}(x,t) = U_G(x,t) \quad , \quad (3.2.23)$$

$$k_G \frac{\partial U_G(l_{DA},t)}{\partial x} = k_M \frac{\partial U_{bA}(l_{DA},t)}{\partial x} \quad , \quad (3.2.24)$$

dabei ist k_G die Wärmeleitfähigkeit des Gases.

Die Temperatur am rechten Rand des Gasraums bleibt zeitlich konstant

$$U_G(l_{DA} + l_G, t) = T_0 \quad . \quad (3.2.25)$$

Aus dem Differentialgleichungssystem (3.2.8) – (3.2.25) kann die oszillierende Temperatur an der Phasengrenze zwischen der Membran und dem Gasraum berechnet werden.

Die Bildung des akustischen Signals wird in der RG-Theorie mit Hilfe eines thermischen „Piston“-Modells beschrieben [90]. In diesem Modell wird der Gasraum in zwei Volumina und zwar in die thermische Diffusionsschicht und in den Rest des Gasraums geteilt (s. Abbildung 6). Die Dicke der Diffusionsschicht entspricht einer thermischen Wellenlänge im Helium-Gas $l_G = 2pm_G$. Jeder Teil des Gasraums besitzt einen eigenen Druck und eine eigene Temperatur sowie ein eigenes Volumen. Das Gesamtvolumen der beiden Teile entspricht immer dem Gesamthalt des Gasraums. Es wird weiterhin angenommen, dass sowohl der Druck in der thermischen Diffusionsschicht als auch die Temperatur in dem restlichen Volumen konstant bleiben.

Die Temperatur der thermischen Diffusionsschicht ändert sich unter dem Einfluss der Wärmewellen aus der Membran periodisch. Infolge dessen ändert sich auch das Volumen der thermischen Diffusionsschicht. Es führt zu einer periodischen Änderung des Volumens vom Restteil. Auf Grund der konstanten Temperatur ändert sich der Druck in diesem Volumenteil. Nach Rosencwaig kann diese Druckänderung aus der mittleren Temperatur in der

thermischen Diffusionsschicht $\bar{U}_{tG}(t)$ berechnet werden:

$$\frac{\partial P(t)}{P_0} = \frac{l_G}{l_G - l_G} \frac{\bar{U}_{tG}(t)}{T_0} \quad , \quad (3.2.26)$$

dabei ist P_0 der Anfangdruck im Gasraum.

Für die mittlere Temperatur in der Diffusionsschicht gilt:

$$\bar{U}_{tG}(t) \approx \frac{1}{2\sqrt{2p}} U_G(l_{AD}, t) e^{i\left(\omega t - \frac{p}{4}\right)} \quad . \quad (3.2.27)$$

Daraus folgt für die Druckänderung im Gasraum:

$$\partial P(t) \approx \frac{\mu_G}{l_G - 2p\mu_G} \frac{P_0}{\sqrt{2T_0}} U_G(l_{DA}, t) e^{i\left(\frac{\omega t - p}{4}\right)}, \quad (3.2.28)$$

dabei ist μ_G die thermische Diffusionslänge im Helium-Gas.

Nach Rosenzweig ist jedoch für das akustische Signal am Mikrofon nur der reale Teil „Re“ von $\partial P(t)$ relevant:

$$\partial P(t) \approx \frac{\mu_G}{l_G - 2p\mu_G} \frac{P_0}{\sqrt{2T_0}} \operatorname{Re} \left[U(l_{DA}, t) e^{i\left(\frac{\omega t - p}{4}\right)} \right]. \quad (3.2.29)$$

3.3. Kombination von ATR und PAS

Die ATR- und die PAS-Technik ergänzen sich hervorragend. Die Kombination der beiden Techniken ermöglicht es, das Penetrationsverhalten umfassend zu charakterisieren. Auf Grund der geringen Eindringtiefe ist die ATR-Technik für Permeationsuntersuchungen geeignet, während die PAS-Technik gut für Penetrationsuntersuchungen ist.

Die ATR-Technik zeichnet sich durch sehr kurze Messzeiten von ca. 15-90 s pro Spektrum aus und ist damit vorteilhaft für die Verfolgung schnell verlaufender Penetrationsprozesse. Für solche Prozesse findet die PAS-Technik weniger Anwendung, da bei dieser Technik die Messzeit 3-5 min beträgt.

Die Kombination der beiden Techniken, der ATR mit der Eindringtiefe bis zu 2 μm und der PAS mit der Abtasttiefe zwischen 5-100 μm ermöglicht die Verfolgung der Wirkstoffpenetration im gesamten SC (ca. 30 μm dick) sowie in einem Teil der Epidermis.

Infolge der geringeren Eindringtiefe kann die ATR-Technik für Freisetzungsuntersuchungen aus dem Donator eingesetzt werden. Durch die Unebenheiten der Formulierungsschicht ist der Einsatz der PAS-Technik für diesen Zweck ungeeignet. Andererseits gestattet die PAS-Technik mit ihrer Tiefenprofilierung, Aussagen über die Wirkstoffverteilung im Akzeptor während des Penetrationsprozesses zu treffen.

Um die Effektivität der spektroskopischen Methoden einschätzen zu können, wurde der Diffusionskoeffizient in einer Membran mit Hilfe der ATR-Technik, der PAS-Technik (Online-Technik) und eines Mehrschichtmembranmodellsystems (Offline-Technik) bestimmt. In der ersten Studie wurde die Clotrimazol-Penetration in eine Dodecanol-Collodium-Membran (DDC-Membran) mit der PAS-Technik und mit dem MSMS untersucht [95]. Die Ergebnisse der ersten Studie zeigten, dass das spektroskopische Verfahren der konventionellen Methode überlegen ist. Bei der PAS-Technik ist das Vertrauensintervall mehr als dreifacher kleiner als bei dem MSMS (s. Abbildung 7).

In einer zweiten Studie wurde die Dithranol-Penetration in der DDC-Membran sowohl mit der ATR-Technik als auch mit der IR-PAS sowie UV-PAS-Technik charakterisiert [39]. Während die PAS-Methode den tiefenabhängigen Diffusionskoeffizienten liefert, wird mit der ATR-Methode und dem Liberationsmodell den mittleren Diffusionskoeffizienten der Membran bestimmt. Die zweite Studie zeigte, dass von den spektroskopischen Methoden die ATR-Technik die höchste Genauigkeit aufweist. Dies ist an der Streuung der Messdaten um die theoretische Penetrationskurve (s. Abbildung 8) gut erkennbar.

Die unterschiedlichen Genauigkeiten von der ATR- und der IR-PAS-Technik sind durch die unterschiedlichen Prinzipien der beiden Methoden bedingt. Die ATR-Technik basiert nur auf dem optischen Absorptionsprozess, während bei der IR-PAS-Technik die optische Absorption mit der thermischen Diffusion und der Bildung der akustischen Welle verknüpft ist. Die möglichen Fehlerquellen wie Umgebungsgeräusche, Erschütterungen, Abhängigkeit der thermischen Eigenschaft von der Feuchtigkeit der Probe sind bei IR-PAS-Technik größer als bei der ATR-Technik. Weiterhin sind die IR-Banden bei unveränderten Bandenposition in PA

Methoden der IR-Spektroskopie für Penetrationsuntersuchungen

Spektren auf Grund der thermischen Ausbereitung wesentlich breiter als bei ATR-Messungen. Weiterhin ist eine starke Überlagerung der Absorptionsanden bei der IR-PAS-Technik in den meisten Fällen nicht zu vermeiden. Dies erschwert eine quantitative Auswertung der Spektren.

Es ist daher empfehlenswert, zuerst eine Voruntersuchung mit der ATR-Technik durchzuführen und anschließend das Tiefenprofil der Wirkstoffpenetration mit der PAS-Technik zu bestimmen. Anhand der ATR-Spektren sind die spektralen Bereiche einfach zu bestimmen, die die deutlichsten Änderungen infolge der Wirkstoffpenetration aufweisen. Dies erleichtert die Suche nach den auswertbaren Bereichen in PA-Spektren.

Die UV-PAS-Technik weist eine zu der ATR-Technik vergleichbare Genauigkeit auf. Der durch UV-PAS bestimmte Diffusionskoeffizient weist im Vergleich zu dem mittels ATR- oder IR-PAS-Technik ermittelten Diffusionskoeffizienten wesentlich geringere Werte auf. Eine Erklärung hierfür liefert die mögliche Degradation von Dithranol während des Versuchs durch die starke UV-Bestrahlung. Eine andere Ursache kann der Sättigungseffekt infolge der sehr großen UV-Abtasttiefe sein.

Die ATR-Technik wird nicht nur für in-vitro, sondern auch für in-vivo Untersuchungen [49, 63, 83, 105] genutzt. In diesen Untersuchungen wurde nach dem Entfernen der Formulierung von der Hautoberfläche die Konzentration der untersuchten Substanz mit der ATR-Technik bestimmt. Neuere Entwicklungen ermöglichen, die photoakustische Spektroskopie für in-vivo Untersuchungen zu nutzen. Jedoch gegenwärtig sind nur UV-PAS [98] oder Laser-PAS [114] Technik möglich.

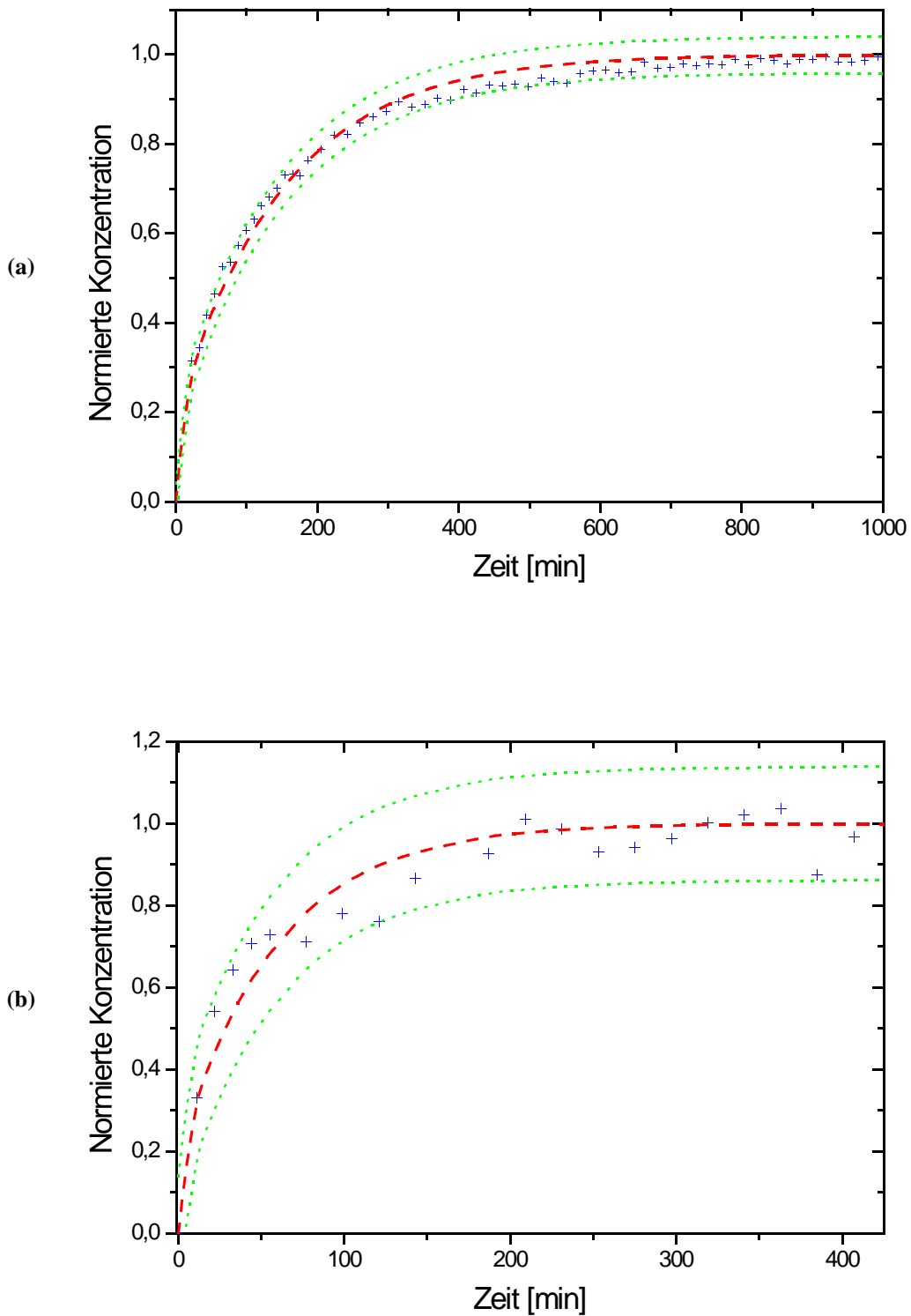


Abbildung 7: Zunahme der normierten Konzentration von Clotrimazol während der Penetration aus einer 10% Vaseline-Suspension bestimmt durch PAS (a) und Mehrschichtmembransystem (b)

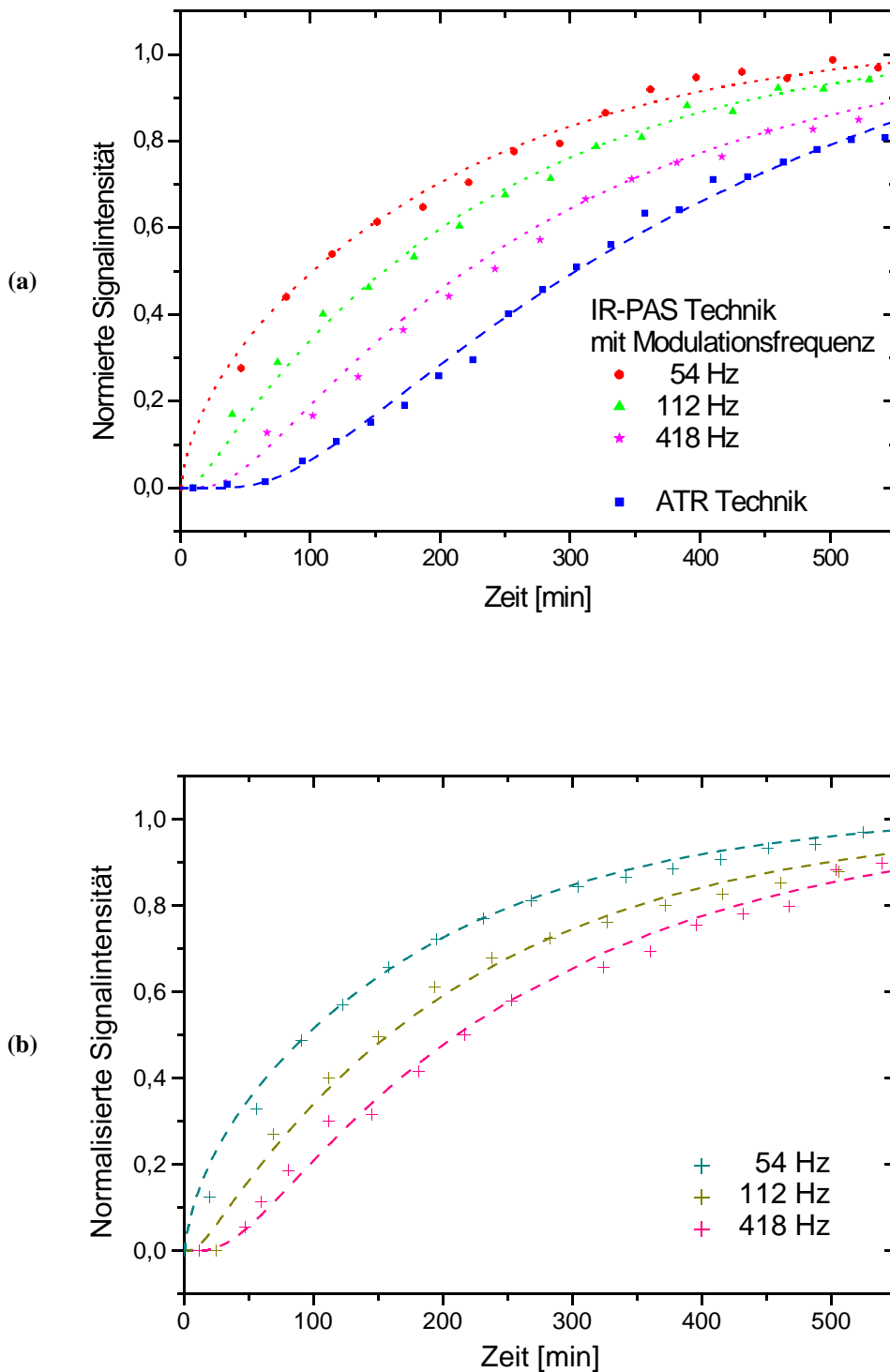


Abbildung 8: Zunahme der normierten Signalintensität von Dithranol während der Penetration aus einer 10% Vaseline-Suspension bestimmt durch IR-ATR/IR-PAS (a) und UV-PAS (b) bei verschiedenen Modulationsfrequenzen